



A role of bone-marrow mesenchymal stem cells in functional maintenance of plasma cells

著者	萱場 敦子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18206号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122681

博士論文（要約）

A role of bone-marrow mesenchymal stem cells
in functional maintenance of plasma cells

（形質細胞の機能維持における骨髄間葉系幹細胞の役割に関する研究）

平成 29 年度
東北大学大学院生命科学研究科
生命機能科学専攻

萱場 敦子

1. 研究背景と目的

免疫記憶は、抗原特異的な抗体を産生する細胞が長寿命を獲得することによって以前に遭遇した病原体に対する記憶を維持し、二次免疫応答に備えることができるシステムである。現在、アレルギーや自己免疫疾患などのような有害な記憶を除去するために重要であると考えられている、抗原特異的な抗体記憶の規模と期間を人為的に制御するための方法はまだ確立されておらず、ニッチにおける記憶細胞の長期生存を構築する分子メカニズムを解明することは重要である。

B細胞は抗原刺激やT細胞からの刺激因子によって、メモリーB細胞と形質細胞の2種類の記憶細胞に分化する。形質細胞はその後、骨髄の適切なニッチに移動し、長期生存能を獲得、抗体を産生し続けながら数十年間生存する。骨髄中の形質細胞はCXCR4を発現しており、そのリガンドであるCXCL12を発現している間質細胞の近傍に定着する。このCXCL12⁺間質細胞には、形質細胞と同様にCXCR4を発現する好酸球、好中球、巨核球、樹状細胞、制御性T細胞なども集まり、形質細胞の生存環境を形成している。これらの細胞はIL-6やAPRILなどの因子を分泌することによって、形質細胞の生存と抗体産生に寄与している。骨髄間質細胞が形質細胞の寿命を維持していることもまた、*in vitro*における共培養実験によって示されている。これらの先行研究により、様々な種類の細胞と分子が長寿命形質細胞の生存と機能に影響を及ぼしていることが示された。しかしながら、間質細胞の形質細胞維持機構における分子機構に関しては、まだ十分に解明されていない。

骨髄において、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) は脂肪細胞や骨細胞、筋細胞などに分化できる多能性の細胞であり、その一方で、免疫抑制機能を有し、B細胞の活性化、増殖、形質細胞への分化の阻害などが報告されている。さらに、中間径フィラメント Nestin 陽性の MSC は骨髄中で造血幹細胞のニッチを形成する。MSC は骨髄中においてはごく少数にすぎないが、それらの免疫抑制機能や造血幹細胞に対する役割に関する知見を踏まえ、本研究では MSC が骨髄形質細胞の維持に関しても役割を担っているという仮説を立てた。

従来、骨髄から MSC を採取する方法として、プラスチックディッシュへの接着性に依存していたが、この方法では数週間を要するため、MSC が他の性質の細胞に分化してしまっている可能性、および造血細胞や他の接着細胞が含まれている可能性が否定できなかった。本研究では、骨髄形質細胞の維持における MSC の実際の役割を検証するために純度の高い MSC を採取する方法の選択が重要であると考え、MSC 特異的な細胞表面マーカー platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) および stem cell antigen-1 (Sca-1) を用いてフローサイトメトリー法によって単離する方法を用いた。マウス的大腿骨および脛骨から PDGFR α ⁺Sca-1⁺ MSC を単離し、同様にフローサイトメトリー法を用いて単離した CD138⁺B220⁻ 骨髄形質細胞と共培養し、形質細胞の生存と抗体産生を検証した。また、単離した MSC に関して単細胞 RNA シーケ

ンス解析 (scRNA-seq) を行い、MSC の遺伝子発現プロファイルを解析した。

2. 結果

1) 形質細胞と MSC の共培養による検証

まず、野生型 C57BL/6 (B6) マウスの MSC と形質細胞の共培養により、形質細胞単独培養よりも抗体産生量および形質細胞の生存率が有意に増加することが ELISpot 法 (**Figure 1**)、ELISA 法および顕微鏡観察によって明らかになった。

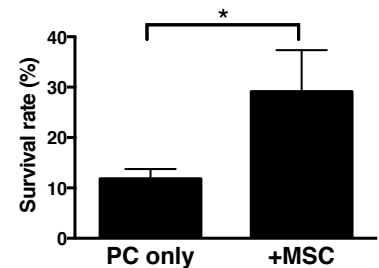


Figure 1. ELISpot 法による IgG 産生形質細胞の生存率の測定

次に、形質細胞の機能の支持における、MSC 由来の液性因子と、MSC-形質細胞間の接触の効果について検証した。ELISA 法により、MSC の培養上清中に形質細胞の生存維持に必要であると報告されている IL-6 が検出された。そこで、*Il6* 欠損マウスの MSC と B6 マウスの形質細胞を共培養した結果、生存率および抗体産生量は野生型 MSC との共培養に比べて有意に減少したが、形質細胞単独培養よりは上昇傾向にあった。したがって、形質細胞の機能支持に寄与する MSC 由来の因子は、IL-6 の効果が大部分ではあるが、他の因子の働きの可能性も除外できなかった。IL-6 以外の分泌因子の機能を探るため、サイトカインアレイにより MSC の培養上清中の因子を解析したところ、いくつかの MSC 特異的な因子を同定したが、これらの組換えタンパク質を添加して形質細胞を培養しても、生存や抗体産生に顕著な効果は見られなかった。一方で、ELISA 法により、形質細胞を骨髄ニッチに引き寄せるために必要とされる CXCL12 が MSC との共培養上清中に検出され、従って MSC は CXCL12 を産生して形質細胞を引き寄せ、近傍で相互作用している可能性が示唆された。さらに、細胞間接触による MSC と形質細胞の相互作用を明らかにするため、トランスウェルアッセイを用い、物理的に MSC と形質細胞の接触を阻害した。その結果、トランスウェル無しの接触している条件と比較して、トランスウェル有りでは、有意に抗体産生量が減少した。したがって、MSC と形質細胞の直接的な接触もしくは近接することが、形質細胞の機能支持に寄与することが明らかになった。

2) MSC の single-cell RNA-sequence (scRNA-seq) 解析

形質細胞の機能支持に関与する MSC 関連因子のさらなる情報を得るために、単細胞 RNA シーケンス解析 (scRNA-seq) を行い、遺伝子発現プロファイルを解析した。MSC および非 MSC (PDGFR α +Sca-1 $^{-}$ 細胞、PDGFR α -Sca-1 $^{+}$ 細胞) 間で false discovery rate 値 (FDR 値) を算出したところ、collagen や proteoglycan などの細胞外マトリクス因子に関する遺伝子が有意に MSC で豊富に発現していることが分かった。さらに

主成分分析の結果、PDGFR α ⁺Sca-1⁺ MSC は広範囲に分布し、その遺伝子発現様式から4つの集団に分けることができた (Figure 2)。これら4集団の遺伝子転写数を比較したところ、CXCL12 や IL-6 などの形質細胞の機能支持に寄与する因子の発現が高い細胞が、それぞれ異なる集団に属していた。さらに各集団において collagen や fibronectin などの細胞外マトリクス関連遺伝子の発現に特徴が見られた。したがって、PDGFR α ⁺Sca-1⁺ MSC はヘテロな細胞集団であり、それぞれの集団が、ニッチへの引き寄せ、生存維持因子の分泌など、形質細胞の機能の支持に対して異なる役割を担っている可能性が示された。

3. 考察

本研究において、骨髓細胞から単離した PDGFR α ⁺Sca-1⁺ MSC が *in vitro* で骨髓形質細胞の機能と生存に及ぼす影響を検証し、MSC が形質細胞の生存と抗体産生を支持することを示した。主に IL-6 がこの形質細胞の支持に重要であることを示した一方で、IL-6 以外の液性因子および形質細胞と MSC の接触もまた形質細胞の機能支持に関与している可能性を示唆した。

また、scRNA-seq と主成分分析の解析結果より、骨髓から単離した PDGFR α ⁺Sca-1⁺ MSC がヘテロな集団であり、遺伝子発現様式により遺伝子発現プロファイルの異なる4つの集団に分けられることも明らかにした。それぞれの遺伝子発現の特徴から、形質細胞のニッチへの引き寄せ、生存環境の形成、生存維持因子の産生など、形質細胞の機能を支持するために各集団が異なる役割を担っていると考えられる。

本研究では、形質細胞の機能的生存を支持するための骨髓における MSC の新しい役割を示した。MSC と形質細胞間の相互作用を明らかにすることで、長期の免疫記憶メカニズム、ならびに記憶を制御するためのツールとして、新たな可能性につながることを期待される。

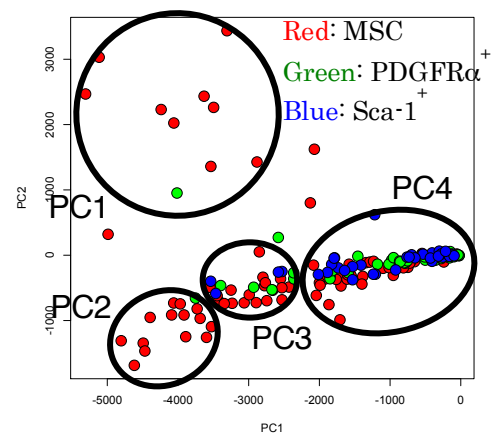


Figure 2. scRNA-seq で得られたデータの主成分分析結果